UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II
Unités d'Enseignement et de Recherche
de Sciences médicales et pharmaceutiques

Année 1973 - Thèse N° 14

Évolution du processus leucémogène chez les souris AKR irradiées traitées par des cellules hématopoïétiques

Thèse pour le Doctorat en Médecine

présentée et soutenue publiquement

le Lundi 22 Janvier 1973

par Marie-Claire KRESSMANN née BARBIER

née le 22 Août 1946 à CREST (Drôme)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. R. STOLL, Professeur . . . . . Président

M. H. DULONG de ROSNAY, Professeur . . . . . } Juges

M. J. MOULINIER, Professeur . . . . . }

M. Cl. LAGARDE, Professeur . . . . . }

M. J.F. DUPLAN, Invité . . . . . }

Éditions Bergeret, 2, rue Bergeret - BORDEAUX
— Tél. 91.12.59 —

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547324_0029

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II
Unités d'Enseignement et de Recherche
de Sciences médicales et pharmaceutiques

Année 1973 - Thèse N° 14

Évolution du processus leucémogène chez les souris AKR irradiées traitées par des cellules hématopoïétiques

Thèse pour le Doctorat en Médecine

présentée et soutenue publiquement

le Lundi 22 Janvier 1973

par Marie-Claire KRESSMANN née BARBIER

née le 22 Août 1946 à CREST (Drôme)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. R. STOLL, Professeur . . . . . Président

M. H. DULONG de ROSNAY, Professeur . . . . . }

M. J. MOULINIER, Professeur . . . . . } Juges

M. Cl. LAGARDE, Professeur . . . . . }

M. J.F. DUPLAN, Invité . . . . . }

Éditions Bergeret, 2, rue Bergeret - BORDEAUX
— Tél. 91.12.59 —

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MON MARI

A MON PERE et A MA MERE

A MA GRAND-MERE

A MES FRERES et SOEURS

A MES AMIS

A TOUS CEUX QUE J'AIME

A tous ceux qui ont participé
à la réalisation technique
de cette thèse :

Monsieur HOURCADE

Pour la qualité de ses documents photographiques.

Mademoiselle N. GUILBAUD

Pour la réalisation du travail de secrétariat.

A Mademoiselle le Docteur E. LEGRAND

Attachée de Recherches de l'INSERM dans l'Unité 117
FONDATION BERGONIE

Pour tout l'enseignement que vous nous avez prodigué depuis plus d'un an, pour toute l'aide et la bienveillance que vous avez bien voulu apporter à ce travail, nous vous remercions sincèrement.

A NOS JUGES

Monsieur le Docteur J.F. DUPLAN

Directeur de Recherche de l'Unité 117
de l'INSERM FONDATION BERGONIE
Chevalier de la Légion d'Honneur

Etre votre élève est pour nous un Honneur. Veuillez accepter pour ce travail l'expression de notre admiration et de nos remerciements respectueux.

Monsieur le Professeur Cl. LAGARDE

Professeur sans Chaire de Carcinologie
Electroradiologiste des Hôpitaux
Directeur de la Fondation Bergonié
(Centre Régional de lutte contre le cancer)
Chevalier de la Légion d'Honneur
Médaille coloniale
Chevalier des Palmes académiques

Vous nous avez permis de réaliser cette thèse à la Fondation Bergonié en mettant à notre disposition des moyens de travail très appréciables. Nous vous en remercions très vivement.

Monsieur le Professeur J. MOULINIER

Professeur associé d'Hématologie
Directeur du Centre de Transfusion Sanguine de Bordeaux

Vous avez accepté de juger ce travail. Nous vous en remercions respectueusement.

Monsieur le Professeur H. DULONG de ROSNAY

Professeur de Bactériologie - Virologie
Biologiste des Hôpitaux, Chef de Service
Chevalier des Palmes académiques

Vous avez accepté de juger ce travail. Nous vous en remercions respectueusement.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur R. STOLL

Professeur de Biologie et d'Histologie
Biologiste des Hôpitaux, Chef de Service
Vice-Président de l'Université de Bordeaux II
Officier des Palmes académiques
Médaille de Vermeil du Service de Santé des Armées

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider cette thèse.

ÉVOLUTION DU PROCESSUS LEUCÉMOGÈNE CHEZ LES SOURIS AKR IRRADIÉES TRAITÉES PAR DES CELLULES HÉMATOPOÏÉTIQUES

P L A N

CHAPITRE I :

INTRODUCTION.

I. HISTORIQUE.

II. FORMES DE LEUCEMIES SPONTANEES CHEZ LES AKR.

III. TRANSMISSION DES LEUCEMIES.

IV. INFLUENCE DE L'IRRADIATION ET DU TRAITEMENT PAR DES CELLULES HEMATOPOIETIQUES SUR LA LEUCEMOGENESE AKR.

CHAPITRE II :

MATERIEL ET METHODES.

I. LES ANIMAUX.

II. IRRADIATION.

III. RESTAURATION.

IV. SACRIFICE ET ETUDE CYTOGENETIQUE.

V. ETUDE DES DEFENSES IMMUNITAIRES.

CHAPITRE III :

RESULTATS.

I. ETUDE DE LA REPOPULATION DU SYSTEME LYMPHOIDE.

A. Injection de cellules de M. O. isogénique

1°) Repopulation médullaire.
2°) Repopulation thymique.
3°) Repopulation ganglionnaire.

B. Cinétique de cellules thymiques allogéniques injectées à AKR.

II. INFLUENCE DES DIFFERENTS TYPES DE RESTAURATION SUR LA LEUCEMOGENESE RADIO-INDUITE.

A. Etude de la durée moyenne de survie.

B. Etude de l'origine des lymphosarcomes en fonction de leur délai d'apparition chez les souris T1ALD irradiées avec 4 fois 175 R et restaurées par de la M.O. isogénique.

C. Etude de l'origine des lymphosarcomes en fonction de leur délai d'apparition chez les souris T1ALD irradiées avec 4 fois 175 R et restaurées par de la M. O. isogénique et du thymus C3H.

D. Etude de l'origine des lymphosarcomes en fonction des différents types de restauration chez les radiochimères T1ALD irradiées avec 4 fois 175 R.

III. APPRECIATION DE LA RECUPERATION DES FONCTIONS IMMUNITAIRES EN FONCTION DES MODALITES DE LA RESTAURATION.

CHAPITRE IV :

DISCUSSION.

I. CINETIQUE DE REPOPULATION DES ORGANES LYMPHOIDES CHEZ LA SOURIS AKR.

A. Repopulation par les cellules médullaires isogéniques.

B. Cinétique des cellules thymiques allogéniques injectées à AKR.

II. INFLUENCE DU TYPE DE RESTAURATION SUR LA LEUCEMOGENESE RADIO-INDUITE.

CHAPITRE V :

CONCLUSIONS.

BIBLIOGRAPHIE

CHAPITRE I

I N T R O D U C T I O N

De nombreux travaux ont déjà été consacrés à l'étude de la lignée de souris AKR qui fait partie des lignées à incidence élevée de leucémies spontanées.

I. HISTORIQUE.

L'origine de la lignée AKR remonte à 1930. Elle fut isolée par le Docteur Jacob FURTH qui travaillait dans le laboratoire du Dr.Eugène L. OPIE, département de Pathologie, Cornell University Médical Collège, à New York. Il lui sembla que les souris étaient très appropriées pour la recherche expérimentale puisque sur le plan clinique et morphologique les leucémies des souris présentent des analogies avec les leucémies humaines. De plus, grâce à la reproduction rapide de la souris, il était possible de développer dans des délais intéressants une lignée d'animaux consanguins permettant des recherches et des expériences reproductibles (11).

FURTH décida donc de développer sa propre lignée à partir d'un stock commercial d'albinos à forte incidence d'affections néoplasiques y compris leucémiques.

Le stock désigné arbitrairement par le symbole "A" fut partagé en un certain nombre de couples.

Les croisements étaient effectués entre frères et soeurs et une sélection fut faite pour produire des souris leucémiques parentes et éliminer de l'élevage les descendants non leucémiques.

Les différentes familles furent désignées par une seconde lettre ajoutée à la lettre "A" : Aa, Ab, Ac, Ad etc ... L'élevage de plusieurs familles fut poursuivi et l'on enregistra dans chaque groupe l'incidence des leucémies spontanées. Après environ 25 générations de croisement entre frères et soeurs, la famille Ak manifesta une incidence relativement élevée de leucémies spontanées, environ 70 % des souris développant une leucémie lymphoïde vers l'âge d'un an.

Avec une grande générosité, le Dr.Jacob FURTH offrit son précieux stock de souris à tous ceux qui étaient intéressés par la recherche sur les leucémies expérimentales.

L'élevage de la lignée Ak fut donc poursuivi dans plusieurs laboratoires. Le stock maintenu dans le laboratoire de Rockefeller Institute, à New York, fut appelé d'abord RIL puis,plus logiquement, AKR (17).

L'incidence des leucémies spontanées chez les AKR varie légèrement selon les différents laboratoires.

Notre élevage provient de la Fondation Curie à Paris où les animaux étaient maintenus depuis 53 générations. En 1969, nous l'avons implanté à la Fondation Bergonié où la lignée se reproduit depuis 11 générations.

II. FORMES DE LEUCEMIES SPONTANEES.

Au point de vue anatomo-pathologique, les leucémies doivent être classées parmi les tumeurs malignes du tissu lympho-réticulaire. Chez les AKR,il s'agit d'une lympho-sarcomatose d'origine thymique. Le processus malin, tout d'abord localisé à un lobe thymique, s'étend progressivement à l'autre, puis revêt une forme généralisée, avec atteinte des ganglions périphériques et mésentériques, de la rate, de la moelle osseuse. A des degrés variables, l'infiltration tumorale peut intéresser le foie, les reins, le sang périphérique, la dissémination des lymphoblastes se faisant par voie veineuse (46). Les cas les plus précoces apparaissent au cours du 6ème mois après la naissance, et la plupart des décès ont lieu entre 250 et 300 jours. La fréquence des leucémies diminue ensuite rapidement et il est rare d'en voir apparaître au-delà de 500 jours. Dans notre élevage, la fréquence des leucémies est de 95 %. La survie moyenne des animaux leucémiques est respectivement de 240 jours pour les femelles et 280 jours pour les mâles.

III. TRANSMISSION DES LEUCEMIES.

L'étude de ces leucémies spontanées chez AKR a commencé vers 1931-32, et l'on avait acquis alors la certitude que la constitution génétique de ces souris était un élément déterminant de la leucémogénèse. Le plus important de ces facteurs génétiques est responsable d'un déséquilibre fonctionnel du thymus. En effet, cet organe, foyer principal de la cancérisation, contrôle aussi le développement des leucémies extrathymiques (1. 11. 17. 33).

En 1951, GROSS a démontré qu'il existait dans cette lignée AKR un virus leucémogène transmis des parents à leur progéniture et présent dans les tissus de l'embryon (14).

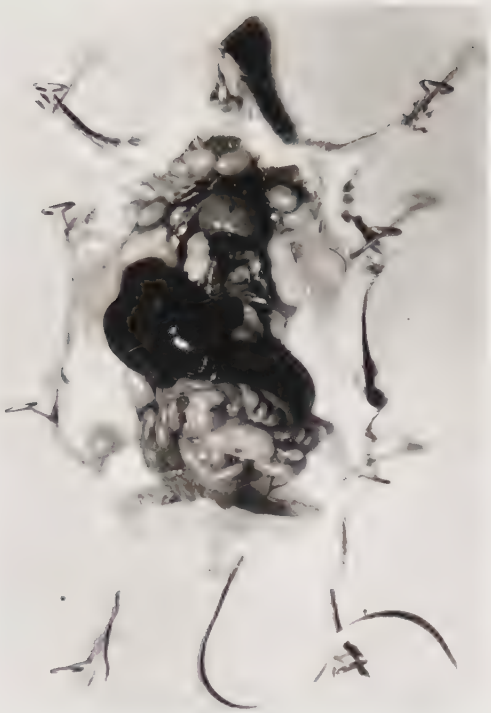

Fig. 1 Souris AKR avec envahissement leucémique du thymus, de la rate et des ganglions sous-maxillaires, axillaires, inguinaux et mesenteriques.

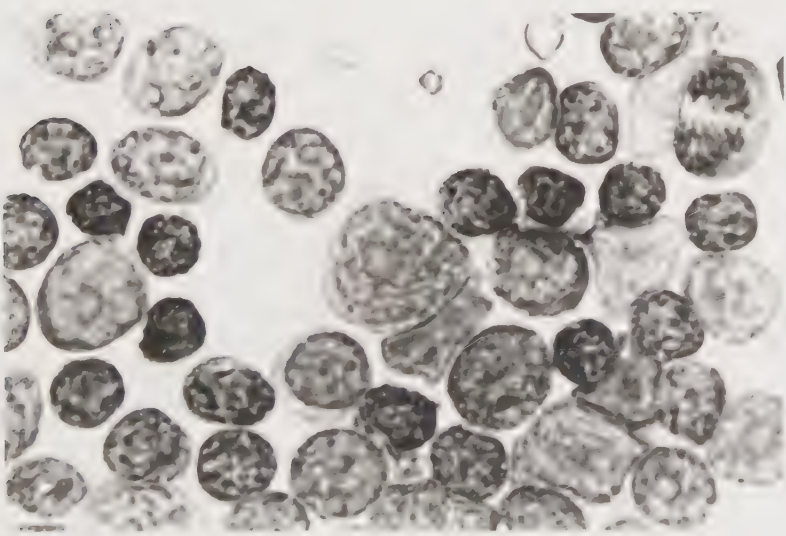

Fig. 2 Aspect cytologique du lymphosarcome thymique AKR (empreinte du thymus).

Il s'agit d'un virus à ARN, dit "Virus de GROSS". Ce virus, capable de transformer en cellules malignes certains éléments de la lignée lymphoïde est un des facteurs déterminants de la leucémogénèse (15. 16).

L'aptitude des souris AKR à développer des leucémies lymphoïdes découle donc de l'existence simultanée, dans cette lignée, d'un virus leucémogène et d'un dysfonctionnement de la lymphopoïèse qui permet au virus d'exprimer son potentiel de cancérisation (28).

IV. INFLUENCE DE L'IRRADIATION ET DU TRAITEMENT PAR DES CELLULES HEMATOPOIETIQUES SUR LA LEUCEMOGENESE AKR.

L'idée d'étudier l'influence des radiations sur la leucémogénèse AKR découle des observations faites chez la souris C57Bℓ. Dans cette dernière lignée, l'incidence des leucémies spontanées est faible. En revanche, en irradiant les animaux dans des conditions particulières quant à la dose administrée et à l'âge des animaux, on obtient 100 % de lymphosarcomes tymiques identiques sur le plan anatomo-pathologique à ceux observés spontanément chez la souris AKR. Chez la souris C57Bℓ, il existe donc, à partir des cellules tymiques survivantes à l'irradiation, un processus d'endorégénération provoquant transitoirement l'accumulation d'éléments sensibles à l'action du virus leucémogène et entraînant la formation d'un lymphosarcome thymique (7. 15. 19. 26. 27). Il était prévisible qu'en irradiant les souris AKR dans les mêmes conditions que les C57Bℓ, on modifierait peu le pourcentage déjà très élevé de leucémies, tout au plus pourrait-on agir sur leur latence.

Les effets de l'irradiation sont fonction de la dose administrée et du mode d'irradiation. Une irradiation unique et sub-léthale inhibe partiellement la leucémogénèse spontanée : la fréquence est inchangée mais la latence est augmentée (15).

A l'inverse, l'irradiation fractionnée (4 irradiations de 175 R à raison d'une par semaine) administrée à des animaux âgés de 30 jours, augmente la fréquence (100 % de leucémies) et diminue la latence. La survie moyenne des animaux leucémiques est alors de 200 jours pour les femelles et 220 jours pour les mâles (4. 5. 6. 8).

Cette accélération de la leucémogénèse peut procéder de plusieurs facteurs dont aucun n'est exclusif des autres :

1°) stimulus de régénération aboutissant dans le thymus à l'accumulation d'éléments cellulaires particulièrement sensibles à l'action du virus de GROSS : en effet, l'irradiation détruit un certain pourcentage de cellules thymiques, entraînant un processus de régénération qui s'opère aux dépens des cellules de la corticale du thymus. Ces éléments peuvent être préférentiellement transformés par le virus de GROSS (30);

2°) libération massive du virus de GROSS sous l'effet de l'irradiation;

3°) dépression transitoire des défenses immunitaires consécutive à l'irradiation et favorisant la multiplication des cellules cancéreuses porteuses de néo-antigènes. En effet, si le virus de GROSS transmis verticalement pendant la période embryonnaire est par là même incapable de susciter des défenses immunitaires, il n'en est pas de même des néo-antigènes portés par les cellules leucémiques (44).

La première hypothèse était vérifiable par la restauration isogénique, c'est à dire par l'injection aux animaux irradiés de cellules hématopoïétiques provenant de donneurs de la même lignée et capables de repeupler le thymus. On sait en effet, essentiellement depuis les travaux de MICKLEM et FORD sur la souris CBA, que les cellules lymphoïdes qui peuplent le thymus et secondairement les organes lymphoïdes, sont issues d'une cellule souche provenant de la moelle osseuse (M.O.)(9. 10.

37. 38. 39). Ces travaux ont été réalisés en injectant aux souris irradiées des cellules provenant de donneurs isogéniques dont les cellules portent un marqueur chromosomique. Les cellules de M.O. injectées repeuplent successivement la M.O., le thymus, les ganglions, ce qui signifie que les cellules médullaires contiennent des précurseurs des cellules thymiques, qui elles-mêmes représentent des précurseurs des cellules lymphoïdes des ganglions. Elles sont donc capables, en se substituant aux cellules détruites par l'irradiation, de s'opposer au processus d'endorégénération thymique et par là même de freiner la leucémogénèse. Mais alors que chez les souris C57Bℓ la restauration isogénique inhibe complètement la radio-leucémogénèse, elle est sans effet sur l'accélération du processus leucémique déclenchée par l'exposition répétée aux rayons X de souris AKR (24. 25).

Les premières expériences ont été réalisées en irradiant des souris AKR et en leur injectant des cellules isogéniques et dépourvues de marqueur chromosomique. Il était donc difficile de savoir à partir de quelles cellules se développaient les lymphosarcomes et dans quelle mesure les cellules du donneur se substituaient à celles du receveur (4. 5. 6).

En 1967, LEONARD et DEKNUDT isolèrent une sous-lignée AKR portant 38 chromosomes (36 acrocentriques et 2 métacentriques) au lieu de 40 acrocentriques chez la souris AKR. Cette réduction apparente du nombre chromosomique est due à l'accolement de 2 paires chromosomiques au niveau du centromère. Il s'ensuit que cette sous-lignée AKR, appelée T1ALD, n'a aucune modification quantitative de son stock chromosomique ni changement phénotypique (32).

Par ailleurs, il a été démontré que les cellules T1ALD manifestaient la même radiosensibilité que les cellules AKR. Le processus leucémique est également identique, la fréquence et la latence des leucémies spontanées sont inchangées par rapport aux AKR (30).

Fig. 3 a) Caryotype de souris AKR à 40 acrocentriques.

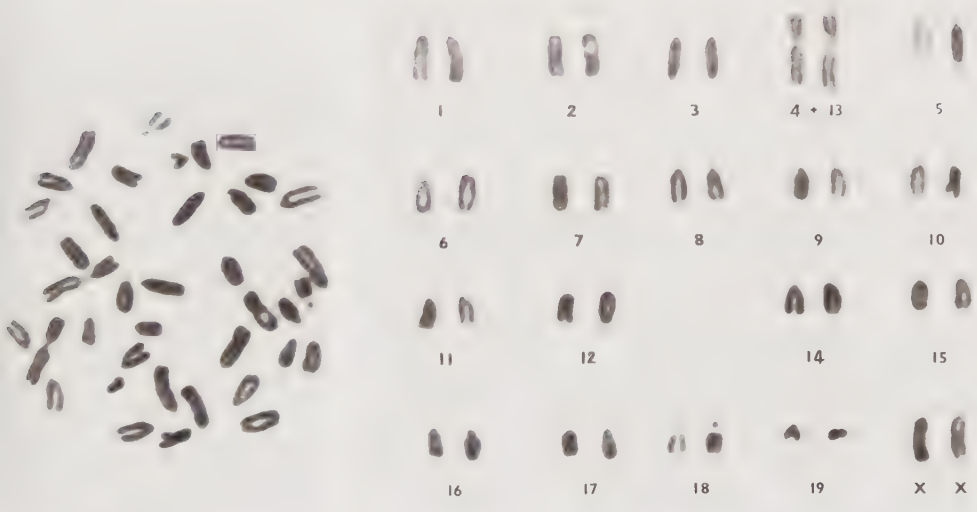

Fig. 3 b) Caryotype de souris T1ALD à 38 acrocentriques et 2 métacentriques (fusion des paires 4 et 13).

L'existence de cette sous-lignée AKR-T1ALD, parfaitement histocompatible avec la souris AKR, a permis de préciser grâce au marqueur chromosomique, l'origine des leucoses chez les radio-chimères, c'est à dire les animaux irradiés et restaurés par des cellules de M.O. (31).

Selon leur délai d'apparition, les leucémies lymphoïdes développées après 4 irradiations de 175 R forment 3 groupes distincts :

a) des leucoses précoces survenant avant 180 jours qui peuvent être considérées comme des radio-leucoses car il n'est pratiquement jamais observé de leucémies spontanées avant cette date. Elles peuvent avoir pour origine aussi bien les cellules de l'hôte que celles du donneur;

b) des leucoses apparaissant entre 180 et 220 jours et qui ont toujours pour origine les cellules du receveur;

c) des leucoses tardives postérieures à 220 jours qui dérivent en majeure partie des cellules du donneur.

Ces expériences montrent que la cancérisation peut s'opérer aussi bien à partir des cellules du receveur survivant à l'irradiation que des cellules du donneur repeuplant progressivement le thymus (8).

On sait par ailleurs, depuis de récents travaux, que dans la lignée AKR, la dépression immunitaire consécutive à 4 irradiations de 175 R persiste beaucoup plus longtemps que dans d'autres lignées. D'autre part, si on restaure les animaux par des cellules de M.O. isogénique, on n'accélère pratiquement pas la régénération des fonctions immunitaires, excepté si on injecte des quantités très importantes de cellules de M.O. (47).

Ces résultats nous ont conduit à entreprendre le travail qui fait l'objet de cette thèse. Il a eu un double objectif :

1°) Etudier chez AKR la cinétique de repopulation des organes lymphoïdes après irradiation fractionnée (4 fois 175 R) et restauration par des cellules de M.O. isogénique.

Le but de ces expériences était de vérifier si, chez AKR où les fonctions thymiques sont connues comme héréditairement perturbées, les cellules médullaires étaient capables de repeupler les organes lymphoïdes dans des délais analogues à ceux décrits par MICKLEM chez la souris CBA.

2°) Etudier l'influence, éventuellement inhibitrice sur la leucémogénèse consécutive à 4 irradiations à 175 R, de l'association aux cellules de M.O. de cellules thymiques provenant d'une lignée à lymphopoïèse normale.

Dans ce but,il convient donc d'étudier :

a) la cinétique des cellules thymiques injectées

b) leur influence sur la leucémogénèse radio-induite

c) l'appréciation par la méthode des plaques de JERNE, de la récupération des fonctions immunitaires, en fonction des modalités de la restauration.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

I. LES ANIMAUX.

Les animaux utilisés appartiennent soit à la lignée AKR, soit à la lignée C3H.

Dans la lignée AKR, il s'agit soit d'animaux AKR porteurs de 40 chromosomes acrocentriques, soit d'animaux T1ALD porteurs de 36 acrocentriques et de 2 métacentriques.

Dans certaines expériences, nous avons utilisé des souris provenant du croisement d'AKR et T1ALD, et porteuses d'un seul chromosome métacentrique. Il est en effet possible d'injecter à de tels animaux à la fois des cellules T1ALD (2 métacentriques) et AKR ou C3H (pas de métacentrique) et de suivre le devenir de ces cellules.

Les souris AKR et C3H sont maintenues à la Fondation Bergonié depuis 1969, et proviennent de l'élevage de la Fondation Curie.

Les animaux T1ALD proviennent de l'élevage du Laboratoire de Génétique du Centre d'Etudes de l'Energie Nucléaire de Mol (Belgique) et sont maintenus dans notre élevage depuis 1968.

II. IRRADIATION.

Les animaux irradiés appartiennent tous à la lignée T1ALD. Les irradiations se font à l'aide d'un appareil à R.X. fonctionnant dans les conditions suivantes: 225 KV, 10 mA, 40 cm de distance anticathode-animal, (CDA = 1,1 mm Cu),le débit moyen est légèrement inférieur à 100 R/mn.

La dose est mesurée à l'aide d'un dosimètre muni d'une échelle à 1.000 R.

Les souris sont soumises à 4 irradiations successives de 175 R chacune, à raison d'une par semaine, les animaux étant placés dans des boîtes en plexiglas contenant au maximum 8 souris. Les animaux sont âgés de 30 jours environ lors de la première irradiation.

Nous avons utilisé dans certaines restaurations des cellules de thymus provenant de donneurs C3H âgés de 30 jours et irradiés à raison d'une dose unique de 1.000 R avant transplantation.

III. RESTAURATION.

Les animaux témoins ne sont pas restaurés. Les animaux restaurés reçoivent le jour de la dernière irradiation :

- soit 10^7 cellules de M.O. provenant de donneurs isogéniques âgés de 2 mois;
- soit 2 10^7 cellules thymiques provenant de donneurs isogéniques ou allogéniques :
  - . les donneurs de thymus AKR sont âgés de 40 à 50 jours
  - . les donneurs de thymus C3H sont âgés de 30 à 40 jours
- soit un mélange de cellules médullaires et thymiques.

La M.O. est prélevée au niveau des fémurs des animaux, et mise en suspension dans du Ringer. La suspension est injectée par voie intraveineuse après numération du nombre des cellules à l'aide d'une cellule de BURKER.

Les thymus prélevés sont également mis en suspension dans du Ringer, broyés à l'aide de ciseaux courbes. Le nombre de cellules étant déterminé, la suspension est injectée par voie intraveineuse après injection préalable d'une petite quantité d'héparine en intramusculaire, afin d'éviter les embolies.

IV. SACRIFICE ET ETUDE CYTOGENETIQUE.

1°) Les souris reçoivent eau et nourriture à volonté.

Les animaux restaurés par des cellules de M.O. dans le but d'étudier la repopulation des organes lymphoïdes sont sacrifiés dans les 80 jours suivant la restauration. Les souris, selon la technique de FORD, reçoivent 1 h 30 avant d'être sacrifiées une injection intra-péritonéale de 125 µg de colchicine (9).

La M.O., le thymus et les ganglions sont prélevés et mis en suspension dans une solution isotonique de citrate de sodium (2,2 %). Les cellules sont soumises à un choc hypotonique par du citrate de sodium à 1 %, puis fixées par un mélange d'alcool absolu, d'acide acétique et de chloroforme.

La suspension est étalée sur des lames. Celles-ci sont colorées au Giemsa, et les mitoses examinées au microscope; pour chaque souris de 50 à 100 mitoses sont étudiées.

2°) Les animaux qui reçoivent des cellules thymiques sont sacrifiés dans les 30 jours suivant la restauration. Le thymus, la rate et les ganglions sont traités de la même façon que précédemment.

3°) Les témoins ainsi que certains des animaux restaurés sont conservés jusqu'à ce qu'ils présentent des signes non équivoques de leucémie. L'âge au décès est noté et on procède de même que précédemment à une étude cytogénétique de leur thymus.

V. ETUDE DES DEFENSES IMMUNITAIRES : TECHNIQUE DES PLAQUES DE JERNE.

Les défenses immunitaires des animaux témoins et restaurés sont appréciées par l'évaluation du nombre de cellules immunologiquement compétentes présentes dans la rate et capables de s'immuniser contre les globules rouges de mouton. Il s'agit d'une étude quantitative du nombre de cellules produisant des hémolysines dans la rate des animaux immunisés (20).

L'immunisation par les globules rouges de mouton est pratiquée 12 jours après l'irradiation et éventuellement la restauration : on injecte par voie intrapéritonéale 0,5 ml d'une suspension à 2 % de globules rouges (GR) de mouton. Huit jours plus tard, ces animaux sont sacrifiés, les rates prélevées, les cellules spléniques mises en suspension.

La suspension de cellules spléniques est incubée en milieu d'Eagle gélosé et mise en présence d'une suspension de GR de mouton. Le mélange est étalé en couche mince dans des boîtes de Pétri.

Les boîtes sont mises à incuber 2 h à 37°. Les anti-corps secrétés par les immunocytes actifs diffusent dans le milieu et se fixent sur les GR. L'addition de complément produit la lyse des GR sensibilisés et la formation d'une zone d'hémolyse macroscopiquement visible. Les zones d'hémolyse sont dénombrées et on en déduit le nombre total de cellules immunologiquement compétentes présentes dans la rate.

CHAPITRE III

R E S U L T A T S

I. ETUDE DE LA REPOPULATION DU SYSTEME LYMPHOIDE.

A. *Injection de cellules de M.O. isogénique.*

Cette étude est réalisée en injectant 10^7 cellules de M.O. AKR à chacune des 50 souris T1ALD soumises à 4 irradiations de 175 R à l'âge de 1 mois. Les pourcentages de cellules AKR et T1ALD sont ensuite évalués dans la M.O., le thymus et les ganglions prélevés chez des animaux dans les 100 jours suivant la dernière des quatre irradiations. L'étude de la rate n'a pas été envisagée en raison de l'hétérogénéité de cet organe qui est chez la souris, à la fois érythromyéloïde et lymphoïde. Les repopulations médullaire , thymique et ganglionnaire sont représentées sur les figures 4, 5 et 6.

1°) Repopulation médullaire.

Les cellules de type receveur peuvent être retrouvées dans la moelle osseuse jusqu'au 50ème jour. Leur taux décroît d'abord rapidement dans les 12 premiers jours suivant la restauration, atteignant environ 50 % vers le 6ème jour et 20 % au 12ème jour. Il diminue ensuite plus lentement, les cellules du receveur étant totalement rem-

LEGENDES DES FIGURES CI-CONTRE :

Fig. 4 - Pourcentage de mitoses à caryotype de type receveur (●) et de type donneur (O) dans la moelle osseuse de souris T1ALD irradiées avec 4 fois 175 R et restaurées par de la moelle osseuse de souris AKR, dans les 100 jours suivant l'irradiation et la restauration.

Fig. 5 - Pourcentage de mitoses à caryotype de type receveur (●) et de type donneur (O) dans le thymus de souris T1ALD irradiées avec 4 fois 175 R et restaurées par de la moelle osseuse AKR, dans les 100 jours suivant l'irradiation et la restauration. (*) indique la présence de cellules porteuses d'un troisième métacentrique caractéristique d'un clone leucémique.

Fig. 6 - Pourcentage de mitoses à caryotype de type receveur (●) et de type donneur (O) dans les ganglions de souris T1ALD irradiées avec 4 fois 175 R et restaurées par de la moelle osseuse AKR, dans les 100 jours suivant l'irradiation et la restauration.

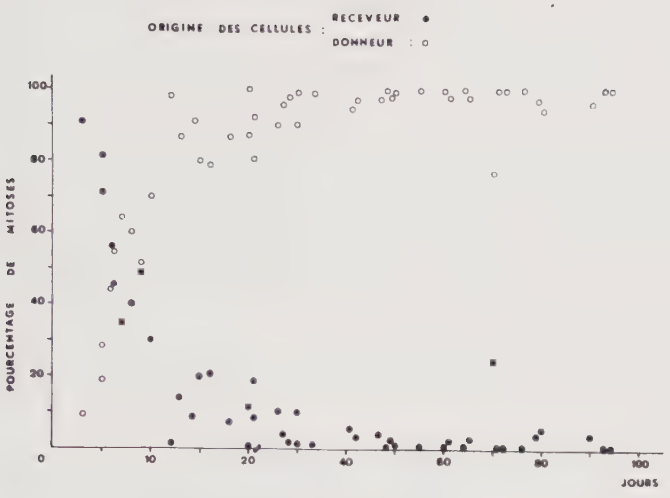

Fig. 4

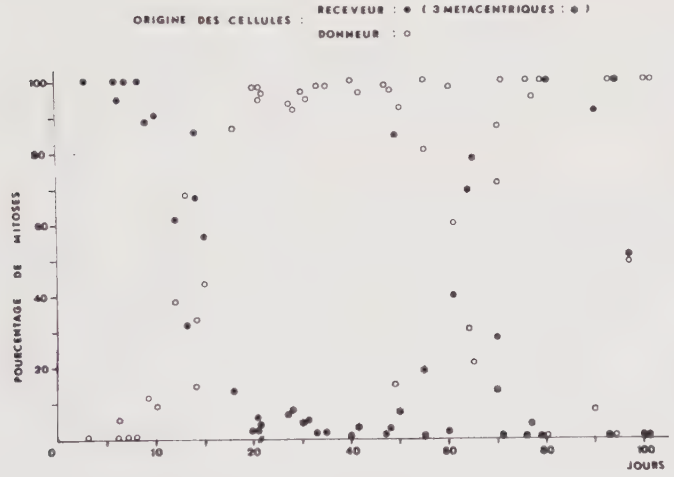

Fig. 5

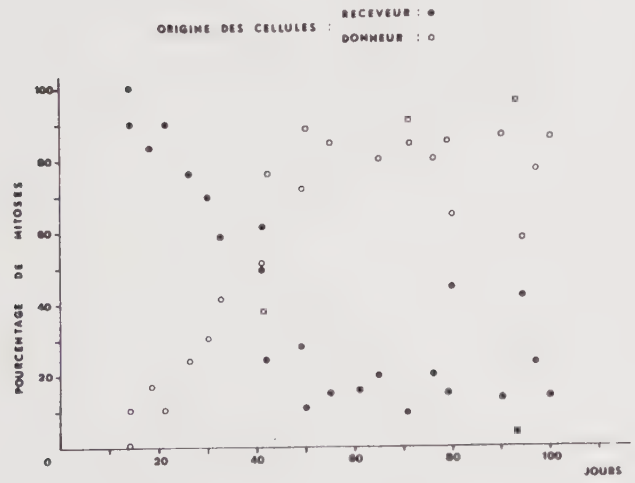

Fig. 6

placées par les cellules du donneur vers le 50ème jour. Après le 70ème jour, les cellules de type receveur ont reparu chez 3 animaux ayant très vraisemblablement un envahissement leucémique de leur moelle à partir d'un lymphosarcome thymique.

2°) Repopulation thymique.

Au niveau du thymus, les premières cellules du donneur n'apparaissent qu'entre le 6ème et le 8ème jour. La repopulation s'effectue entre le 10ème et le 20ème jour. Vers le 15ème jour,le thymus est à moitié repeuplé par les cellules du donneur qui, au 20ème jour, représentent 90 % des cellules présentes dans cet organe. Lorsque persistent des cellules de l'hôte, leur pourcentage n'excède jamais 4 %.

A partir du 40ème jour, environ la moitié des thymus examinés sont en totalité de type donneur, alors que dans les autres existent des cellules de type receveur. Le nombre de ces dernières peut parfois augmenter très rapidement : 85 % de cellules de type receveur au 48ème jour. Le pourcentage des cellules TIALD croît avec le temps et varie entre 3 et 100 %. Dans certains de ces thymus repeuplés partiellement ou totalement à partir des cellules de l'hôte (TIALD), nous avons noté qu'un petit nombre de ces cellules étaient porteuses d'un troisième chromosome métacentrique surnuméraire. Dans un précédent travail réalisé dans notre laboratoire, nous avons pu montrer qu'il s'agissait d'une anomalie spécifique des clônes leucémiques qui n'est jamais observée chez des souris non leucémiques même après irradiation (29).

3°) Repopulation ganglionnaire.

Au niveau des ganglions, (Fig. 6) les cellules de type donneur apparaissent aux alentours du 15ème jour. Leur taux atteint 50 % entre le 30ème et le 40ème jour et s'élève irrégulièrement jusqu'au 50ème jour. Cependant, à l'inverse de ce qui se passe dans la M.O. et le thymus, les cellules de type receveur ne disparaissent jamais complètement. A partir du 50ème jour leur taux reste stable et compris entre 10 et 20 %. De même que dans le thymus, leur nombre chez certains animaux s'élève rapidement vers le 80ème jour, ce qui correspond à la prolifération de clônes leucémiques.

B. *Cinétique de cellules thymiques allogéniques injectées à AKR.*

Cette étude est réalisée en injectant 2 10^7 cellules de thymus provenant de souris de la lignée C3H âgées de 30 à 40 jours. Les souris recevant l'injection appartiennent à la lignée T1ALD et ont été préalablement soumises à 4 irradiations de 175 R dont la 1ère à l'âge de 1 mois. Le thymus, la rate et les ganglions sont prélevés dans les 30 jours qui suivent la dernière irradiation et l'injection de cellules thymiques.

Ces organes sont soumis à une étude cytogénétique. Les cellules thymiques de la lignée C3H éventuellement présentes peuvent être aisément différenciées des cellules du receveur, puisqu'elles contiennent 40 chromosomes acrocentriques, alors que celles de la lignée T1ALD, comme nous l'avons déjà vu précédemment, contiennent 38 chromosomes dont 2 métacentriques.

Cette étude cytogénétique nous montre que les cellules thymiques C3H ne sont jamais retrouvées dans le thymus, ni dans la rate, ni dans les ganglions.

Ces résultats nous ont été confirmés par une autre expérience réalisée à l'aide de souris hybrides F1 (C3H x AKR/T1ALD). Chez ces hybrides, l'injection de

cellules thymiques C3H ou T1ALD dans les mêmes conditions que précédemment ne nous a permis de retrouver ces cellules que chez quelques animaux, et en faible proportion puisque leur pourcentage n'excède pas 8 % dans le thymus et 4 % dans les ganglions.

II. INFLUENCE DES DIFFERENTS TYPES DE RESTAURATION SUR LA LEUCEMOGENESE RADIO-INDUITE.

Les résultats des expériences que nous avons réalisées sur l'influence de la restauration ont été résumés dans 4 tableaux où sont précisés :

- la durée moyenne de survie des souris AKR et T1ALD de l'un et l'autre sexe (Tableau I);
- le pourcentage de leucémies survenant avant 180 jours (Tableau I), cette limite d'âge ayant été choisie en raison de la rareté des leucémies survenant spontanément avant cette date (4 % chez AKR);
- l'origine des lymphosarcomes en fonction de leur délai d'apparition et en fonction des divers types de restauration (Tableaux II, III, IV).

A. *Etude de la durée moyenne de survie.*

Le Tableau I, où sont indiqués les durées moyennes de survie et les pourcentages de leucémies survenant avant 180 jours, donne les résultats d'expériences antérieures portant sur les souris témoins (non irradiées), les souris irradiées avec 4 fois 175 R, et sur un groupe qui avait reçu immédiatement après la dernière irradiation une injection de M.O. isogénique (AKR). Il est complété par nos propres expériences relatives aux effets sur la leucémogénèse de divers types de restauration associant la M.O. et les cellules thymiques.

DUREES MOYENNES DE SURVIE ET POURCENTAGES DE LEUCEMIES SURVENANT AVANT 180 JOURS CHEZ LES SOURIS AKR ET T1ALD

Lignée	*Nombre de Souris*	*Dose de Rayons X en R*	*Restauration*	*Pourcentage de Leucémies survenant avant 180 j.*	*Durée Moyenne de Survie en jours*	
					Femelles	*Mâles*
T1 ALD	60	0	-	0	232	285
AKR	48	0	-	4	240	280
T1 ALD	28	175 R x 4	-	12	205	245
T1 ALD	25	175 R x 4	AKR (M. O.)	34	196	229
T1 ALD	44	175 R x 4	C3H (Th.)	37	178	190
T1 ALD	43	175 R x 4	AKR ou AKR x T1 ALD (M. O.) + C3H (Th.)	21	196	240
T1 ALD	38	175 R x 4	T1 ALD ou AKR (Th.)	20	226	212
T1 ALD	31	175 R x 4	C3H (Th.) 1 000 R	30	193	207

On voit que :

- chez les animaux spontanément leucémiques, la durée moyenne de survie est, pour la lignée T1ALD, de 232 jours pour les femelles et 285 jours pour les mâles. Chez AKR, elle est de 240 jours pour les femelles et 280 jours pour les mâles.

  Le pourcentage de leucémies survenant avant 180 jours est nul pour la lignée T1ALD, il est de 4 % pour la lignée AKR.

- l'irradiation sub-léthale et fractionnée (4 fois 175 R) accélère le processus leucémique : 205 jours pour les femelles et 245 jours pour les mâles; 12 % des leucémies surviennent avant 180 jours.

- l'injection de M.O. isogénique (AKR) à des animaux T1ALD irradiés avec 4 fois 175 R modifie peu la latence : 196 jours pour les femelles et 229 jours pour les mâles; 34 % des leucémies surviennent avant 180 jours.

- l'injection de thymus C3H à des animaux T1ALD irradiés avec 4 fois 175 R donne une durée moyenne de survie de 178 jours pour les femelles et 190 jours pour les mâles; 37 % des leucémies surviennent avant 180 jours.

- l'injection d'un mélange de M.O. isogénique AKR ou F1 (AKR x AKR/T1ALD) et de thymus C3H à des animaux T1ALD irradiés avec 4 fois 175 R donne une durée moyenne de survie de 196 jours pour les femelles et 240 jours pour les mâles; 21 % des leucémies surviennent avant 180 jours.

- l'injection de thymus isogénique (AKR ou T1ALD) donne une durée moyenne de survie de 226 jours pour les femelles et 212 jours pour les mâles; 20 % des leucémies surviennent avant 180 jours.

- l'injection de thymus C3H irradié à 1.000 R donne une durée moyenne de survie de 193 jours pour les femelles et 207 jours pour les mâles; 30 % des leucémies surviennent avant 180 jours.

En résumé, la seule modification significative de la leucémogénèse est une accélération consécutive à l'injection de cellules thymiques C3H.

B. *Etude de l'origine des lymphosarcomes en fonction de leur délai d'apparition chez les souris T1ALD irradiées avec 4 fois 175 R et restaurées par de la M.O. isogénique.*

Le Tableau II rapporte les résultats d'expériences antérieures à notre travail. Les animaux ont été répartis en 3 groupes suivant la durée moyenne de leur survie. Pour chaque souris, on a déterminé l'origine des cellules lymphosarcomateuses en se fondant sur leurs caractères cytogénétiques.

On voit que :

- avant 180 jours, les lymphosarcomes, dits précoces, sont :
  - . soit de type receveur : pour 5 souris,
  - . soit de type donneur : pour 2 souris,
  - . soit de type mixte : pour 1 souris.
- de 181 à 220 jours, 8 lymphosarcomes sont de type receveur, 1 seul est de type donneur.
- après 220 jours, les lymphosarcomes, dits tardifs, sont tous de type donneur (8 souris).

T A B L E A U I I

ORIGINE DES LYMPHOSARCOMES EN FONCTION DE LEUR DELAI DE SURVENUE CHEZ LES RADIOCHIMERES T1ALD IRRADIEES AVEC 4 FOIS 175 R ET RESTAUREES PAR DE LA M.O. ISOGENIQUE

Nombre de Souris	*Age au décés en jours*	*Origine du Lymphosarcome*						*Fréquence des Lymphosarcomes*	
		Receveur		*Donneur*		*Mixte*			
		Nombre	*Pourcentage*	*Nombre*	*Pourcentage*	*Nombre*	*Pourcentage*	*Nombre*	*Pourcentage*
8	112 à 180	5	20 %	2	8 %	1	4 %	8	32 %
9	181 à 220	8	32 %	1	4 %	-		9	36 %
8	221 à 336	-		8	32 %	-		8	32 %
Total 25	112 à 336	13	52 %	11	44 %	1	4 %	25	100 %

C. *Etude de l'origine des lymphosarcomes en fonction de leur délai d'apparition chez les souris T1ALD irradiées avec 4 fois 175 R et restaurées par de la M.O. isogénique et du thymus C3H.*

Le Tableau III nous montre, pour les mêmes tranches d'âge au décès que dans le groupe précédent, l'origine des lymphosarcomes :

- avant 180 jours, les lymphosarcomes précoces sont tous de type receveur (8 souris),
- de 181 à 220 jours les lymphosarcomes sont :
  . soit de type receveur (10 souris)
  . soit de type donneur (2 souris)
- après 220 jours, les lymphosarcomes dits tardifs sont :
  . soit de type receveur (8 souris)
  . soit de type donneur (10 souris).

En comparant les Tableaux II et III nous voyons que dans le 2ème groupe d'animaux, restaurés par de la M.O. AKR et du thymus C3H, il existe une augmentation significative du nombre de lymphosarcomes développés à partir des cellules du receveur :

- avant 180 jours,nous en avons 5 de type receveur et 2 de type donneur dans le 1er groupe, alors qu'ils sont tous de type receveur dans le 2ème groupe;
- de même après 220 jours,ils sont tous de type donneur dans le 1er groupe alors que dans le 2ème groupe il y en a 8 de type receveur et 10 de type donneur.

T A B L E A U I I I

ORIGINE DES LYMPHOSARCOMES EN FONCTION DE LEUR DELAI DE SURVENUE CHEZ LES RADIOCHIMERES T1ALD IRRADIEES AVEC 4 FOIS 175 R ET RESTAUREES PAR DE LA M.O. ISOGENIQUE ET DU THYMUS C3H

Nombre de Souris	*Age au décés en jours*	*Origine du Lymphosarcome*				*Fréquence des Lymphosarcomes*	
		Receveur		*Donneur*		*Nombre*	*Pourcentage*
		Nombre	*Pourcentage*	*Nombre*	*Pourcentage*		
8	112 à 180	8	21 %	-		8	21 %
12	181 à 220	10	26 %	2	6 %	12	32 %
18	221 à 398	8	21 %	10	26 %	18	47 %
Total 38	112 à 398	26	68 %	12	32 %	38	100 %

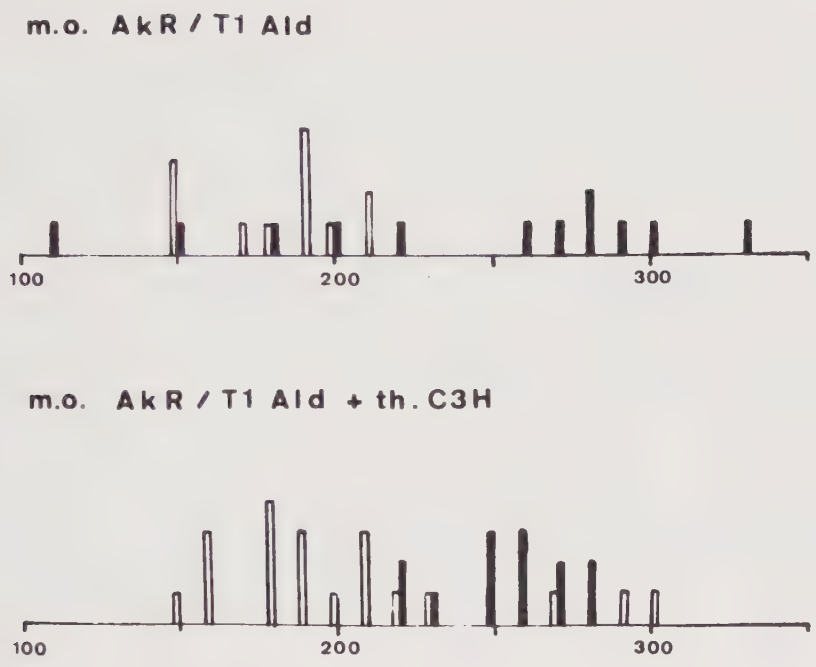

Fig. 7 Histogramme montrant la répartition dans le temps des lymphosarcomes de type donneur ou receveur, selon la durée de vie de chacune des souris T1ALD irradiées avec 4 fois 175 R et restaurées soit par de la moelle osseuse AKR/T1ALD, soit de la moelle osseuse AKR/T1ALD et du thymus C3H. En abscisse est représenté le temps en jours, en ordonnée est représenté le nombre de souris (une souris correspond à la hauteur des barres que nous observons à 200 jours).
Lymphosarcomes de type donneur (AKR ▮) barre noire.
Lymphosarcomes de type receveur (T1ALD ▯) barre blanche.

L'histogramme de la figure 7 reprend les résultats que nous venons d'exposer et montre clairement la répartition dans le temps des lymphosarcomes de type donneur ou receveur, selon la durée de vie de chacune des souris restaurées soit par de la M. O. AKR, soit par de la M.O. AKR et du thymus C3H.

Nous voyons qu'il existe un regroupement dans le temps des lymphosarcomes de type donneur :

ils s'étalent de 112 jours à 330 jours dans le premier groupe (M.O. seule) alors qu'ils se concentrent de 221 à 280 jours dans le 2ème groupe (M.O. AKR plus thymus C3H).

Nous observons le phénomène inverse pour les lymphosarcomes de type receveur qui sont regroupés entre 150 et 210 jours dans le 1er groupe et s'étalent de 150 à 300 jours dans le 2ème groupe.

D. Etude de l'origine des lymphosarcomes en fonction des différents types de restauration chez les radiochimères T1ALD irradiées avec 4 fois 175 R.

Tous les animaux de chaque groupe étant morts leucémiques, le Tableau IV nous montre que :

- dans le groupe d'animaux restaurés avec de la M.O. isogénique (AKR),52 % des lymphosarcomes sont de type receveur, 48 % de type donneur;
- dans le groupe d'animaux restaurés avec du thymus C3H, 100 % des lymphosarcomes sont de type receveur, c'est à dire que l'on n'a jamais de lymphosarcomes développés à partir des cellules thymiques injectées;
- dans le groupe d'animaux restaurés par un mélange de M.O. AKR et de thymus C3H,68 % des lymphosarcomes sont de type receveur, 32 % sont de type donneur et développés uniquement à partir des cellules de M.O. isogénique ;

T A B L E A U I V

ORIGINE DES LYMPHOSARCOMES CHEZ LES RADIOCHIMERES T1ALD IRRADIEES AVEC 4 FOIS 175 R EN FONCTION DES DIFFERENTS TYPES DE RESTAURATION

RESTAURATION	*CARYOTYPE DES LYMPHOSARCOMES*	
	Receveur	*Donneur*
MO AKR	52 %	48 %
Th C3H	100 %	0 %
MO AKR + Th C3H	68 %	32 %
Th T1ALD ou AKR	100 %	0 %
Th C3H (1000 R)	100 %	0 %

- dans le groupe d'animaux restaurés par du thymus isogénique (AKR ou T!ALD),100 % des lymphosarcomes sont de type receveur;
- dans le groupe d'animaux restaurés par du thymus C3H irradié à 1.000 R, 100 % des lymphosarcomes sont de type receveur.

Ces résultats nous montrent donc qu'aucun lymphosarcome ne se développe à partir des cellules thymiques injectées, qu'elles soient allogéniques (C3H) ou isogéniques (AKR ou T!ALD).

Par contre, nous obtenons des lymphosarcomes à partir des cellules médullaires injectées et nous constatons que, si nous ajoutons des cellules thymiques C3H aux cellules médullaires, nous augmentons significativement le pourcentage de lymphosarcomes développés à partir des cellules du receveur; les pourcentages sont respectivement de 52 % avec la M.O. isogénique seule et de 68 % avec la M.O. et le thymus C3H.

III. APPRECIATION DE LA RECUPERATION DES FONCTIONS IMMUNITAIRES EN FONCTION DES MODALITES DE LA RESTAURATION.

La technique des plaques de JERNE, utilisée ici, consiste à évaluer le nombre de cellules productrices d'hémolysines présentes dans la rate 8 jours après immunisation par des GR de mouton.

Les résultats de cette étude figurent dans le tableau V :

- les animaux irradiés avec 4 fois 175 R présentent $2,26 \times 10^3$ cellules immunologiquement compétentes par rate;
- les animaux irradiés avec 4 fois 175 R et restaurés par de la M.O. isogénique (AKR), en présentent $3,44 \times 10^3$;
- les animaux irradiés avec 4 fois 175 R et restaurés par du thymus C3H, en présentent $2,6 \times 10^3$;
- les animaux irradiés avec 4 fois 175 R et restaurés par de la M.O. AKR et du thymus C3H, en présentent 5×10^3;
- les animaux irradiés avec 4 fois 175 R et restaurés par du thymus isogénique T1ALD, en présentent $1,8 \times 10^3$;
- les animaux irradiés avec 4 fois 175 R et restaurés par du thymus C3H irradié à 1.000 R, en présentent $1,8 \times 10^3$.

Ces résultats nous montrent qu'il n'existe pas de différence significative dans le nombre de cellules productrices d'hémolysines entre,d'une part, les animaux irradiés et non restaurés, et d'autre part les animaux irradiés et restaurés par de la M.O. seule ou du thymus seul (C3H ou T1ALD).

Par contre, il existe une augmentation significative du nombre de ces cellules quand les animaux sont restaurés par un mélange de cellules de M.O. et de thymus.

T A B L E A U V

NOMBRE DE PLAQUES DE JERNE PAR RATE EN FONCTION DE LA RESTAURATION CHEZ LES SOURIS AKR/T1 ALD IRRADIEES AVEC 4 FOIS 175 R

Restauration	*Nombre moyen de plaques par rate x 10^3*
-	2,36
M. O. AKR	3,44
Th. C3H	2,60
M. O. AKR + Th. C3H	5
Th. T1ALD	1,8
Th. C3H (1 000 R)	1,8

CHAPITRE IV

D I S C U S S I O N

I. *CINETIQUE DE REPOPULATION DES ORGANES LYMPHOIDES CHEZ LA SOURIS AKR.*

A. *Repopulation par les cellules médullaires isogéniques.*

Les expériences rapportées reposent sur l'analyse cytogénétique des cellules hématopoïétiques. Nous n'analysons que les cellules en mitose, ce qui est un facteur limitatif quant à l'étude de la population cellulaire d'un organe. Les résultats sont donc profondément influencés par les rythmes de multiplication propres aux divers éléments constitutifs des différents organes étudiés. Ainsi dans la M.O., les cellules sont essentiellement érythromyéloïdes, dans le thymus, ce sont les thymocytes corticaux, et dans les ganglions les lymphocytes des centres germinatifs et des follicules. Enfin, la fragilité de certaines cellules au moment de leur mitose peut conduire à des distorsions quantitatives importantes.

Compte-tenu de ces limitations, les renseignements fournis par cette méthode permettent de suivre l'évolution numérique des différentes lignées hématopoïétiques, dans la mesure où la localisation de leurs éléments permet une distinction topographique.

Les résultats de notre étude de la repopulation du système lymphoïde ont permis de préciser dans un modèle expérimental totalement histocompatible, les notions déjà acquises dans des systèmes expérimentaux utilisant soit des donneurs de M.O. partiellement histocompatibles parce que possèdant le même allèle (H2K) au locus H2, soit des hybrides de souris AKR et CBA T6T6 (21. 35. 36).

Comme nous l'avons déjà précisé, la cinétique de régénération de la M.O., du thymus et des ganglions observée chez AKR est superposable à celle décrite par MICKLEM chez les radiochimères CBA - CBA T6T6 (37. 38. 39). Ceci est bien entendu limité aux 40 jours qui suivent immédiatement l'irradiation c'est à dire à la période antérieure à celle où apparaissent chez AKR et T1ALD des altérations dues au processus leucémique :

Il existe une exorepopulation totale et définitive de la M.O., qui s'oppose à l'endorepopulation partielle et probablement transitoire du thymus. Quant à la repopulation ganglionnaire à partir des cellules exogènes, elle est encore plus tardive que celle du thymus et demeure toujours incomplète. Ceci ne semble pas pouvoir être attribué à une différence de radiosensibilité des éléments constitutifs de ces organes (8).

Il paraît plus probable que cela dépend des modalités de leurs repopulations respectives. Les cellules souches injectées se fixent immédiatement dans la M.O. et y prolifèrent rapidement rendant très improbable la mise en évidence d'une endorégénération.

En revanche,les éléments exogènes issus de la M.O., ne parviennent pas au thymus avant le 6ème ou le 8ème jour qui suit l'irradiation, c'est à dire à une époque où les foyers cellulaires endogènes ont déjà pu se reconstituer à partir des cellules thymiques que l'irradiation n'avait pas détruites.

Il en est de même au niveau des ganglions où les éléments exogènes ne sont retrouvés qu'à partir du 15ème jour qui suit l'irradiation et proviennent des éléments qui se sont développés dans le thymus, alors que l'endorégénération ganglionnaire est plus rapide et que l'endorégénération thymique peut elle aussi fournir précocement des cellules lymphoïdes aux ganglions.

Nous pouvons donc conclure que chez AKR, où le système lymphoïde est considéré comme génétiquement perturbé, la cinétique des cellules lymphoïdes ne diffère en rien de celle de la souris normale (1. 30. 33).

B. *Cinétique des cellules thymiques allogéniques injectées à AKR.*

L'étude cytogénétique du thymus, de la rate et des ganglions dans les 30 jours qui suivent la dernière irradiation et l'injection des cellules thymiques, ne nous a pas permis de retrouver ces cellules thymiques sous forme de métaphases. Ceci pose le problème de la survie de ces cellules thymiques que nous avons étudié par ailleurs dans un système histocompatible d'hybrides F1 (C3H x AKR/T1ALD). Si l'on injecte des cellules thymiques C3H ou T1ALD à cette lignée hybride préalablement irradiée avec 4 fois 175 R, l'étude cytogénétique nous permet de retrouver les cellules injectées en très petite quantité : 8 % dans le thymus, 4 % dans les ganglions. Ce qui montre que parmi les cellules thymiques injectées, seul un petit nombre est capable de se diviser, bien que ces cellules soient capables de repeupler les organes du receveur.

En effet, comme l'ont montré les travaux de GALTON et REED, si l'on injecte des cellules ganglionnaires marquées à la thymidine tritiée à un receveur syngénique, ces cellules sont retrouvées en grand nombre dans les ganglions et la rate, et en petites quantités dans le thymus. Les cellules ne semblent pas se diviser (13).

Le fait que nous ne les retrouvions pas sous forme de mitoses n'est donc pas surprenant et ne signifie pas qu'elles ne repeuplent pas les organes lymphoïdes. De plus, le fait que notre système soit allogénique compromet la survie prolongée de ces cellules, bien que chez AKR la dépression immunitaire consécutive à l'irradiation soit particulièrement prolongée (47).

II. INFLUENCE DU TYPE DE RESTAURATION SUR LA LEUCEMOGENESE RADIO-INDUITE.

Les résultats que nous avons rapportés nous permettent de constater que la survie moyenne des animaux leucémiques n'est pas significativement différente lorsque les animaux irradiés avec 4 fois 175 R sont :

- soit non restaurés,
- soit restaurés par de la M.O. isogénique,
- soit restaurés par du thymus isogénique,
- soit restaurés par de la M.O. isogénique et du thymus allogénique.

Par contre, nous notons une accélération de la leucémogénèse dans le groupe d'animaux irradiés avec 4 fois 175 R et restaurés par du thymus allogénique seul. En effet la survie moyenne est respectivement pour les mâles et les femelles de 55 jours et de 27 jours inférieure à celle des témoins irradiés.

La restauration par du thymus C3H irradié à 1.000 R avant sa transplantation, ne modifie pas la survie moyenne par rapport aux témoins. Ce qui prouve que l'effet enregistré avec l'injection de cellules C3H nécessite une certaine survie de la population thymique injectée.

D'autre part,si nous comparons l'origine des lymphosarcomes dans les groupes d'animaux restaurés par de la M.O. isogénique seule, ou par de la M.O. isogénique et du thymus allogénique, nous constatons dans le 2ème groupe une augmentation significative du pourcentage de lymphosarcomes développés à partir des cellules du receveur.

Tout se passe donc comme si l'injection de cellules thymiques allogéniques :

- ou bien favorisait le processus d'endorégénération thymique et par là même le développement des premiers foyers leucémiques à partir des cellules du receveur,

- ou bien au contraire, inhibait la transformation maligne des cellules de type donneur. Dans cette perspective, le pourcentage des leucoses de type donneur serait diminué sans que la latence en soit changée et le pourcentage des leucémies de type receveur indirectement augmenté.

Encore qu'aucun argument ne nous permette d'écarter définitivement la première hypothèse, elle semble peu vraisemblable.

En effet,dans nos conditions d'irradiation, le thymus se repeuple tant par la multiplication de ses propres cellules survivantes, que par celle des cellules souches qui lui sont fournies par la moelle osseuse, cellules survivant à l'irradiation et cellules provenant de la restauration, le premier phénomène étant relayé par le second. Notre première hypothèse impliquerait donc un ralentissement de l'exorégénération thymique par les cellules de moelle provenant du donneur. Les cellules thymiques allogéniques injectées combleraient partiellement la déplétion du système lymphoïde secondaire consécutive à l'irradiation en se fixant dans les ganglions et la rate, d'où ralentissement de l'exorégénération thymique.

Cette hypothèse est peu compatible avec les résultats que nous avons obtenus dans une autre série expérimentale : des hybrides de première génération F1 (C3H x AKR/T1ALD) ont été restaurés par un mélange de cellules de M.O. AKR ou C3H et de thymus AKR ou C3H. Dans les 4 types de restauration possibles,nous avons constaté que la repopulation de la M.O. et du thymus était exactement superposable à celle observée chez AKR après restauration par des cellules de moelle osseuse isogénique seule.

La seconde hypothèse s'appuie essentiellement sur la distribution des leucémies de type donneur en fonction du temps, et particulièrement sur l'absence de leucémies précoces.

Elle impliquerait un changement qualitatif des cellules thymiques développées à partir des cellules de type donneur, leur conférant un caractère qui les rendrait

moins sensibles à l'action du virus de GROSS. On peut, par exemple, concevoir que les cellules de thymus injectées soient capables d'agir en favorisant l'accumulation dans le thymus d'éléments à un stade de différenciation tel qu'ils soient moins sensibles à l'action du virus de GROSS. Cette action pourrait s'opérer au niveau de la moelle osseuse.

Cette hypothèse est parfaitement compatible avec les notions acquises en cinétique. Cependant, elle ne permet pas d'expliquer pourquoi l'injection de cellules thymiques C3H seules accélère la leucémogénèse par rapport aux témoins non restaurés.

En examinant les résultats relatifs à la récupération des fonctions immunitaires en fonction des modalités de la restauration, nous constatons qu'il n'existe pas de différence significative entre les souris irradiées avec 4 fois 175 R et :

- soit non restaurées,
- soit restaurées par de la M.O. isogénique,
- soit restaurées par du thymus isogénique,
- soit restaurées par du thymus allogénique,
- soit restaurées par du thymus allogénique irradié à 1.000 R.

Par contre, nous constatons que les défenses immunitaires sont deux fois plus élevées lorsque les animaux sont restaurés par un mélange de cellules médullaires isogéniques et de cellules thymiques allogéniques ($5.\ 10^3$ plaques de JERNE par rate).

Pour interpréter ces résultats, il convient de se référer à un précédent travail où il avait été démontré qu'en injectant des quantités croissantes de cellules de M.O. (10^7 à $3\ 10^7$) à des AKR irradiés avec 4 fois 175 R, mais à un âge différent (2 mois à la première des quatre irradiations) on n'augmentait pas le nombre de CFP par rapport aux témoins non restaurés (47).

Ce résultat est confirmé par nos expériences où le nombre de CFP (cellules formatrices de plaques) des animaux restaurés par de la M.O. ne diffère pas significativement de celui des témoins.

Il faut toutefois noter que la dépression immunitaire consécutive à l'irradiation est beaucoup moins intense (2,4 10^3 CFP par rate) lorsque la première irradiation a lieu à l'âge de 1 mois, ce qui est le cas dans nos expériences, que lorsqu'elle a lieu à 2 mois (0,7 10^3 CFP par rate).

Comme les conditions optimales pour accélérer les leucémies sont également d'irradier les animaux à l'âge de un mois, on peut remarquer que cette accélération de la leucémogénèse se produit chez un animal dont les défenses immunitaires sont diminuées mais non absentes.

Nos résultats doivent également s'interpréter à la lumière des notions maintenant acquises dans le domaine de l'immunité de type humoral. De très nombreux travaux y ont contribué, parmi lesquels il convient de retenir ceux de METCALF, DAVIES, MITCHISON, MITCHELL et MILLER (2. 3. 40. 41. 42. 43).

Nous en rappelons brièvement l'essentiel : l'immunité de type humoral c'est à dire la sécrétion d'anticorps est le fait de cellules lymphoïdes habituellement appelées "lymphocytes de type B". Ces éléments dont les précurseurs se trouvent dans la moelle osseuse peuplent les organes lymphoïdes secondaires : région médullaire de la rate (pulpe rouge) et les ganglions (zone paracorticale) sans que le thymus intervienne, semble-t-il, dans leur différenciation puisque les animaux thymectomisés sont capables d'une réaction immunitaire de type humoral. On décrit une 2ème population lymphocytaire ou "lymphocytes T" qui assurent les défenses de type cellulaire. Leurs précurseurs proviennent également de la moelle osseuse. Ils se différencient ensuite dans le thymus et peuplent secondairement les organes lymphoïdes secondaires. Cette population est totalement déprimée par la thymectomie.

Les lymphocytes T à eux seuls sont incapables de sécréter des anti-corps mais leur association aux cellules B majore notablement la réponse immunitaire des cellules à certains types d'antigènes (41). Cet effet de coopération se produit entre cellules isogéniques mais est également possible entre cellules allogéniques (40. 41).

Lorsqu'on injecte des cellules de M.O. à des animaux irradiés dont on veut mesurer les défenses immunitaires, on leur fournit des précurseurs des cellules B et T mais la maturation des premières est plus rapide que celle des cellules T, c'est pourquoi dans les 15 jours suivant l'irradiation on n'apprécie que la sécrétion d'hémolysines due aux cellules B non "stimulées" par les cellules T. En revanche, en injectant à la fois des cellules B et T, on apprécie l'effet de "coopération" entre les deux types de cellules.

Le fait qu'il n'existe pas, dans nos expériences, de différence significative entre le nombre de CFP chez les animaux témoins et ceux qui reçoivent seulement de la M.O. isogénique, peut s'expliquer, soit par l'inaptitude des cellules de M.O. AKR à fournir des cellules sécrétrices d'hémolysines en l'absence de cellules thymiques coopérantes, soit par une maturation anormalement lente du compartiment des cellules B. Le fait que l'association de cellules thymiques C3H augmente significativement le nombre des CFP est en faveur de la première hypothèse mais ne permet cependant pas d'éliminer la deuxième. Des expériences sont actuellement en cours dans le but de préciser ce phénomène.

Le fait que l'injection de cellules thymiques C3H ou T1ALD seules ne modifie pas les défenses immunitaires montre que les défenses mesurées chez les témoins sont le fait des cellules B survivantes à l'irradiation et que l'effet de stimulation des cellules T se produit aussi bien à partir des cellules T survivantes que des cellules T qui sont injectées.

Il ressort de nos résultats qu'il n'existe pas de corrélation entre la récupération des défenses immu-

nitaires telle qu'on peut l'apprécier par la technique de JERNE, et un éventuel effet inhibiteur sur la leucémogénèse. Bien au contraire la latence des leucémies est la même chez les témoins et les animaux restaurés par de la M.O. isogénique et du thymus C3H qui ont un nombre de CFP double des témoins.

Par ailleurs, le nombre de CFP chez les animaux recevant du thymus C3H seul ne diffère pas de celui des témoins bien que la leucémogénèse soit accélérée.

Plusieurs hypothèses d'ordre immunologique peuvent expliquer ces faits :

1°) Il pourrait exister *une compétition immunitaire* entre les néo-antigènes portés par les cellules des premiers foyers leucémiques et les cellules thymiques C3H partiellement compatibles, ce qui entraînerait une déviation des processus de défense immunologique et éventuellement une accélération relative du processus leucémique.

Ceci est tout à fait compatible avec les défenses humorales que présentent les animaux témoins qui interviennent peut-être contre le processus leucémique en l'absence de toute restauration mais sont rapidement débordées.

2°) On peut également évoquer la production *d'anticorps facilitants* induits par les cellules thymiques C3H. En effet, bien qu'il n'existe pas de différence dans le nombre de cellules immunologiquement compétentes, que les animaux irradiés aient reçu ou non du thymus C3H, il peut s'agir d'une différence qualitative dans le type d'anticorps induits. Cependant, cette hypothèse est à avancer avec réserve car, si la production d'anticorps facilitants est un phénomène déjà décrit dans le développement des tumeurs solides, on n'en a encore jamais observés dans la leucémogénèse (22. 23. 48. 49).

3°) Nous pouvons aussi invoquer une réaction *d'immunité cellulaire* de type "greffon contre hôte"; cette réaction, telle qu'on l'observe après injection de cellules lymphoïdes allogéniques à des animaux irradiés, serait induite par les cellules thymiques C3H et dirigée contre les antigènes d'histo-compatibilité des cellules de l'hôte. Il y aurait alors, dans cette perspective, destruction de cellules AKR dont un certain nombre de cellules immunologiquement compétentes éventuellement capables de s'immuniser contre les néo-antigènes des cellules des foyers thymiques leucémiques (44. 48).

Cependant, plusieurs arguments peuvent être invoqués à l'encontre de cette hypothèse :

- Nous n'observons pas de diminution du nombre de cellules immunologiquement compétentes chez les animaux recevant du thymus C3H : 2,6 10^3 CFP par rapport à 2,4 10^3 chez les animaux seulement irradiés.

- Cette réaction d'immunité cellulaire n'est jamais rencontrée chez des radiochimères restaurées par des cellules de M.O. isogénique et des cellules de thymus allogénique. Au contraire, il semble plutôt y avoir dans ce cas une coopération, même en cas d'histo-incompatibilité partielle, puisque nous observons une augmentation des défenses immunitaires dans le groupe d'animaux irradiés et restaurés par un mélange des 2 types cellulaires, le nombre de cellules immunologiquement compétentes que nous avons observé étant de 5. 10^3.

CHAPITRE V

C O N C L U S I O N S

De ce travail nous pouvons conclure tout d'abord que chez AKR, où les fonctions thymiques sont connues comme héréditairement perturbées, les cellules médullaires isogéniques injectées sont capables de repeupler les organes lymphoïdes dans des délais normaux.

L'association de cellules thymiques allogéniques aux cellules médullaires isogéniques ne modifie ni la fréquence ni la latence des leucémies par rapport à celles des témoins irradiés ou des animaux qui ne reçoivent que des cellules médullaires.

Mais cette association modifie le rapport des pourcentages de lymphosarcomes de types receveur et donneur par rapport à celui des animaux ne recevant que de la M.O. : elle diminue les lymphosarcomes de type donneur qui passent de 48 à 32 %.

Tout se passe donc comme si les cellules thymiques allogéniques :

- ou bien intervenaient au niveau des cellules du receveur, les rendant plus sensibles à l'action du virus de GROSS, ce qui semble peu probable,

- ou bien au contraire modifiaient les cellules du donneur, les rendant moins sensibles à l'action du virus de GROSS, par exemple, en accélérant leur différenciation.

Par ailleurs, l'injection de cellules thymiques allogéniques seules accélère la leucémogénèse radio-induite par rapport aux témoins irradiés. Plusieurs hypothèses d'ordre immunologique ont été invoquées, comme pouvant expliquer ces phénomènes : existence d'une compétition immunitaire, induction d'anticorps facilitants, réaction de type "greffon contre hôte", mais aucune ne peut tout expliquer de façon exclusive.

La récupération des fonctions immunitaires déprimées par l'irradiation est variable selon le type de restauration : seuls les animaux restaurés par des cellules médullaires isogéniques en même temps que des cellules thymiques allogéniques ont des défenses significativement plus élevées que celles des témoins.

Il semble que les cellules médullaires AKR seules, en l'absence de cellules thymiques, soient incapables de fournir des cellules pouvant sécréter des hémolysines.

La récupération des fonctions immunitaires ne semble donc pas influencer la leucémogénèse radio-induite chez AKR, du moins dans le sens d'un éventuel effet inhibiteur.

SERMENT

En présence des maîtres de cette École, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Reconnaissant envers mes Maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes confrères pour des frères, et s'ils devaient apprendre la médecine ou recourir à mes soins je les instruirai et les soignerai sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Vu,
Le Président de l'Université de Bordeaux II :
H. BRICAUD

Bon à imprimer,
Le Président de Thèse :
R. STOLL

Vu et permis d'imprimer,
Bordeaux, le 9 Janvier 1973
Le Chancelier des Universités :
R. PAULIAN

B I B L I O G R A P H I E

1. COLE R. K. and FURTH J. - Experimental Studies on the genetics of spontaneous leukemia in mice. Cancer Res.,1941, 1, 957-965.

2. DAVIES A. J. S., LEUCHARS E., WALLIS V., MARCHANT R. and ELLIOTT E. V. - The failure of thymus derived cells to produce anti-body. Transplantation, 1967, 2, 222-231.

3. DAVIES A. J. S. - The thymus : the cellular basis of Immunity. Transplantation, 1969, 1, 43-91.

4. DUPLAN J. F. - Diminution de la leucémogénèse spontanée chez les souris AKR irradiées en totalité et greffées avec des cellules hématopoïétiques homologues. C. R. Acad. Sc., 1958, 247, 662-664.

5. DUPLAN J. F. - Influence de l'irradiation X et de la restauration isologue ou homologue sur la leucémogénèse spontanée dans la lignée AKR. Nouv. Revue Fr. Hémat., 1962, 2, 551-562.

6. DUPLAN J. F. - Stimulation de la leucémogénèse AKR par les irradiations fractionnées. Effet de la restauration isogénique. C. R. Soc. Biol., 1965, 160, 1277-1281.

7. DUPLAN J. F. and LATARJET R. - Studies on the mechanism of radiation induced leukemogenesis in C57Bℓ mice.
Cancer Res., 1966, 26, 395-399.

8. DUPLAN J. F. et LEGRAND E. - Etude cytogénétique de la leucémogénèse lymphoïde chez les radiochimères isogéniques AKR/T1ALD.
C. R. Acad. Sc., 1969, 268, 2990-2992.

9. FORD L. E. - The use of chromosome markers in H.S. MICKLEM and J.F. LOUTIT,"Tissue Grafting and Radiation".
1 vol.,Académic Press, édit., New York, 1966.

10. FORD L. E. and MICKLEM H. S. - The thymus and lymph-nodes in radiation chimaeras.
Lancet, 1963, 1, 359-362.

11. FURTH J., SEIBOLD H. R. and RATHBONE R. R. - Experimental studies on lymphomatosis of mice.
Am. J. Cancer, 1933, 19, 521-604.

12. FURTH J. - Recent studies on the etiology and nature of leukaemia.
Blood, 1951, 6, 964-975.

13. GALTON M. and REED P. B. - Entry of lymph-node cells into the normal thymus.
Transplantation, 1966, 4, 168-177.

14. GROSS L. - Pathogenic properties, and "vertical" transmission of the mouse leukemia agent.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1951, 78, 342-348.

15. GROSS L. and FELDMAN D. - Electronmicroscopic studies of radiation induced leukemia in mice : virus release following total-body X-ray irradiation.
Cancer Res., 1968, 28, 1677-1685.

16. GROSS L. - Viral etiology of leukemia and lymphomas. Editorial.
Blood, 1965, 25, 377-381.

17. GROSS L. - Oncogenic viruses.
1 vol.,Pergamon Press édit., New-York 1966.

18. HARAN-GHERA N. - The mechanism of radiation action in leukaemogenesis. The role of radiation in leukaemia development.
Brit. J. Cancer, 1967, 21, 739-749.

19. ILBERY P. L. T. and BARNES C. A. - Origin of neoplastic cells following prophylaxis of radiation induced mouse leukaemia.
Int. J. Cancer, 1970, 5, 124-135.

20. JERNE N. K., NORDIN A. A. and HENRY C. - The agar plaque technique for recognizing antibody-producing cells p. 109 in : "Cell Bound Antibodies".
B. Amos and H. Kapowski edit. Wistar Institute Press, Philadelphia,1963.

21. JULIEN P. et RUDALI G. - Effet des rayons X sur la leucémogénèse des souris AKR : rôle d'une lésion généralisée du système hémopoïétique.
Int. J. Cancer, 1967, 2, 245-255.

22. KALISS N. - Immunological enhancement of tumor homografts in mice, a review.
Cancer Res., 1958, 18, 992-1003.

23. KALISS N. - The element of immunological inhancement. A consideration of the mechanism.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 1962, 101, 64-79.

24. KAPLAN H. S. - Preliminary studies on the effectiveness of local irradiation in the induction of lymphoïd tumors in mice.
J. Nat. Cancer Inst., 1949, 10, 260-270.

25. KAPLAN H. S., BROWN M. B. and PAULL J. - Influence of bone-marrow injections on involution and neoplasia of mouse thymus after systemic irradiation.
J. Nat. Cancer Inst., 1953, 12, 765-775.

26. KAPLAN H. S. - On the etiology and pathogenesis of the leukaemia : a review.
Cancer Res., 1954, 14, 535-548.

27. KAPLAN H. S. - The pathogenesis of experimental lymphoïd tumors in mice.
In Proc. Second Canadian Cancer Conference, 1 vol.,Academic Press, édit., New-York, 1957.

28. LATARJET R. and DUPLAN J. F. - Experiments and discussion on leukaemogenesis by cell-free extracts of radiation inducec leukaemia in mice.
Int. J. Rad. Biol., 1962, 5, 339-344.

29. LEGRAND E. and DUPLAN J. F. - Presence of an additional metacentric chromosome in AKR/T1ALD leukaemic cells.
Nature, 1970, 225, 737-738.

30. LEGRAND E. et DUPLAN J. F. - Etude de la leucémogénèse AKR à 1'aide d'un marqueur cytogénétique.
Int. J. Cancer, 1971, 7, 443-454.

31. LEONARD A. et DEKNUDT G. - Leucémogénèse spontanée et stimulée chez des souris AKR à 38 ou 40 chromosomes in Radiation induced Cancer p. 158-164 International Atomic Energy Agency, Vienne, 1969.

32. LEONARD A. and DEKNUDT G. - A New Marker for Chromosome Studies in the Mouse.
Nature, 1967, 214, 504-505.

33. MAC DOWELL E. L. and RICHTER M. N. - Mouse leukemia IX. The role of heredity in spontaneous cases.
Arch. Path., 1935, 20, 709-724.

34. METCALF D. - Thymus grafts and leukemogenesis.
Cancer Res., 1964, 24, 1952-1957.

35. METCALF D. and WAKONIG-VAARTAJA R. - Stem cell replacement in normal thymus grafts.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1964, 115, 731.

36. METCALF D., WAKONIG-VAARTAJA R. and BRADLEY T.R. - The growth repopulation of thymus grafts placed under the kidney capsule.
Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1965, 43, 17.

37. MICKLEM H. S., FORD C. E., EVANS E. P. and GRAY J. - Interrelationships of myeloïd and lymphoïd cells : studies with chromosome-marked cells transfused into léthally-irradiated mice. Proc. royal Soc. B., 1966, 165, 78-102.

38. MICKLEM H. S. and LOUTIT J. F. -"Tissue Grafting and Radiation". 1 vol., Academic Press, édit., New-York and London, 1966.

39. MICKLEM H. S., CLARKE C. M., EVANS E. P. and FORD C. E. - Fate of chromosome marked mouse bone-marrow cells transfused into normal syngenic recipients. Transplantation, 1968, 6, 299-302.

40. MILLER J. F. A. P. - Interaction entre les cellules de lignée thymique et médullaire dans la réponse immunitaire. Rev. Franc. Etudes Clin. et Biol., 1969, 14, 614-621.

41. MILLER J. F. A. P. - Interaction between lymphocytes in Immune Responses. Cellular Immunology, 1971, 2, 469-495.

42. MITCHELL G. F., MISHELL R. I. and HERZENBERG L.A. - Studies on the influence of T cells in antibody production. In AMOS. B. "Progress in immunology", 1 vol., Academic Press, édit., New-York and London, 1971.

43. MITCHISON N. A. in MAKELA O., CROSS A. M. and KOSUMEN T. U. "Cell interaction in immune responses" 1 vol.,Academic Press, édit., New-York, 1971.

44. OLD L. J. and BOYSE E. A. - Immunology of experimental tumors. Ann. Rev. Med., 1964, 15, 167-186.

45. RICH M. A. -"Experimental leukemia". 1 vol.,North-Holland Publishing company,edit., Amsterdam, 1970.

46. RUDALI G., DUPLAN J. F. et LATARJET R. - Leucémogénèse chez des souris AKR injectées à la naissance avec un extrait leucémique aqueux isologue.
Bull. du Cancer, 1957, 44, 440-443.

47. UMALY R. and DUPLAN J. F. - Comparative effectiveness of restoration of the immune response with isogenic bone marrow in irradiated AKR and C57B& mice.
Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol., 1971, 16, 582-585.

48. VOISIN G. A. - L'immunité de transplantation dans BORDET.
Immunologie, 1 vol.,Flammarion,edit.,Paris,1972.

49. VOISIN G. A. - Immunité, Facilitation et Tolérance.
Ann. Inst. Pasteur, 1972, 122, 609-618.

50. WALLIS V., DAVIES A. J. S. and KOLLER P. C. - Inhibition of Radiation induced leukaemia by the injection of haematopoïétic tissue : a study of chimaerism.
Nature, 1966, 210, 500-504.

EDITIONS BERGERET -2, rue Bergeret- BORDEAUX. Tél. 91.12.59